

ISOLASI PROTEIN KACANG MERAH DAN KACANG HIJAU MENGGUNAKAN METODE ASAM BASA DIKOMBINASIKAN DENGAN PROSES ENZIMATIS

[Isolation of Protein from Red Beans and Green Beans using Acid-Base Method Combined with Enzymatic Processes]

Slamet Hadi Kusumah¹⁾, Robi Andoyo^{2)*}, dan Tita Rialita²⁾

¹⁾ Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknik, Universitas Islam Al-Ihya, Kuningan

²⁾ Departemen Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Industri Pertanian, Universitas Padjadjaran, Bandung

Diterima 16 Januari 2021 / Disetujui 8 Desember 2021

ABSTRACT

Red beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and greens beans (*Phaseolus raditus* L.) proteins contain high amount of essential amino acids lysine and leucine. The study aimed to determine the optimum conditions for protein isolation process from red beans and green beans flour to produce the highest protein content. Additionally, an enzymatic hydrolysis was aimed to produce isolates or protein concentrates of red beans and green beans with good digestibility. The research method used was the Response Surface Methodology (RSM) Box-Behnken Design with Design Expert 10. The variables used in this process were extraction temperature (30-50°C), extraction pH (8.50-9.50), and time extraction (30-60 minutes). The results showed that the optimum conditions for the extraction of red beans protein were extraction pH of 8.60, temperature of 30°C, and time of 30.1 minutes, with the resulting protein content of 86.88±1.38% with a validity value of 0.91. Meanwhile, the optimum conditions for the green beans protein extraction process were extraction pH of 8.83, extraction temperature of 30°C, extraction time of 30 minutes which yielded protein content of 88.27±1.08% and a validity value of 0.97. Enzymatic hydrolysis using of 3% (w/w) bromelain enzyme on red bean and mung bean protein concentrate powder was able to increase protein digestibility by 15.61 and 14.51%, respectively.

Keywords: concentrate protein, enzymatic hydrolysis, protein isolation

ABSTRAK

Protein kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan kacang hijau (*Phaseolus raditus* L.) memiliki asam amino esensial lisin dan leusin yang tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum proses isolasi protein tepung kacang merah dan kacang hijau yang menghasilkan kadar protein tertinggi. Tahap modifikasi hidrolisis enzimatis bertujuan untuk menghasilkan isolat atau konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau dengan daya cerna protein yang baik. Penelitian ini menggunakan metode Response Surface Methodology (RSM) Box-Behnken Design melalui Software Desain Expert 10. Variabel yang digunakan pada proses ini adalah suhu ekstraksi (30-50°C), pH ekstraksi (8,50-9,50), dan lama ekstraksi (30-60 menit). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum proses ekstraksi protein kacang merah dilakukan pada pH ekstraksi 8,60, suhu ekstraksi 30°C, lama ekstraksi 30,1 menit, dan menghasilkan kadar protein 86,88±1,38% dengan nilai validitas 0,91. Kondisi optimum proses ekstraksi protein kacang hijau dilakukan pada pH ekstraksi 8,83, suhu ekstraksi 30°C, lama ekstraksi 30 menit dan menghasilkan kadar protein 88,27±1,08% dengan nilai validitas 0,97. Hidrolisis enzimatis dengan penambahan enzim bromelin 3% (b/b) pada bubuk konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau mampu meningkatkan daya cerna protein berturut-turut sebesar 15,61 dan 14,51%.

Kata kunci: hidrolisis enzimatis, isolasi protein, konsentrat protein

*Penulis Korespondensi: E-mail: r.andoyo@unpad.ac.id

PENDAHULUAN

Persentase stunting di Jawa Barat saat ini adalah 34,51% yang tersebar di beberapa Kabupaten diantaranya Sukabumi, Cianjur, Cirebon dan Garut (Yusuf *et al.*, 2018). Stunting didefinisikan sebagai keadaan dengan tinggi badan di bawah 2 simpang baku dari median pada kurva pertumbuhan tinggi badan. Penyebab dan faktor risiko stunting terjadi karena faktor internal seperti genetik ataupun eksternal seperti asupan nutrisi kurang dan infeksi kronis. Anak balita stunting lebih rendah mengonsumsi protein dibandingkan anak balita dengan status gizi baik (Ernawati *et al.*, 2016). Anak-anak dengan status gizi baik mempunyai asam amino esensial seperti lisin dan leusin yang lebih tinggi dibandingkan dengan anak stunting (Semba *et al.*, 2016).

Komoditas lokal Jawa Barat yang berpotensi sebagai sumber protein nabati (*plant-based protein*) adalah kacang merah dan kacang hijau dengan kadar protein masing-masing sekitar 22 dan 20% (Kusumah *et al.*, 2020a). Kandungan asam amino esensial biji kacang merah dan kacang hijau cukup lengkap, yakni isoleusin, leusin, lisin, metionin, fenilalanin, threonin, dan valin (Almatsier, 2013). Pada penelitian sebelumnya (Kusumah *et al.*, 2020a), telah dilakukan identifikasi asam amino pada tepung kacang merah dan kacang hijau. Asam amino esensial terbesar yang terdapat pada tepung kacang merah dan tepung kacang hijau adalah lisin sebesar 15.929,89 dan 14.916,14 mg/kg, kemudian terbesar kedua adalah leusin sebesar 12.385,81 dan 12.694,86 mg/kg, masing-masing (Kusumah *et al.*, 2020a). Hasil tersebut memberikan penguatan bahwa protein kacang merah dan kacang hijau berpotensi untuk menjadi sumber asam amino esensial pada berbagai macam produk *high protein food*.

Protein kacang merah dan kacang hijau dapat diisolasi dan diolah menjadi bubuk isolat atau konsentrat protein (Gunarti *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2018). Isolasi atau konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau diperoleh dengan cara mengendapkan protein pada titik isoelektriknya. Berdasarkan penelitian sebelumnya (Kusumah *et al.*, 2020a), telah diidentifikasi titik isoelektrik kacang merah dan kacang hijau yaitu masing-masing pH 4,56 dan 4,81.

Isolasi protein kacang-kacangan menggunakan metode asam basa dimulai dengan proses ekstraksi protein pada larutan alkali. Pada kondisi basa, proses ekstraksi menghasilkan protein yang lebih banyak karena protein yang terlarut mudah dipisahkan dari residu. Kondisi basa juga dapat merusak asam amino yang mengandung sulfur diantaranya triptofan, treonin, lisin, dan metionin (Kanetro, 2017). Penggunaan variasi suhu pemanasan dan lama ekstraksi dalam teknik isolasi

protein kacang-kacang juga menentukan rendemen isolat atau konsentrat protein yang dihasilkan. Proses ekstraksi protein kacang merah dan kacang hijau yang dilakukan pada suhu ruang selama 30 menit dan pH ekstraksi 9,00 menghasilkan rendemen protein sebesar 81,87 dan 76,99%, masing-masing (Kusumah *et al.*, 2020b). Kondisi ekstraksi ini perlu dioptimasi agar bisa menghasilkan isolat atau konsentrat protein yang lebih banyak.

Tantangan dari penelitian ini adalah mendapatkan konsentrat atau isolat protein kacang merah dan kacang hijau dengan profil yang baik seperti bentuk oligopeptida (2-10 asam amino) sehingga dapat memperbaiki daya cerna protein. Teknik yang dapat dilakukan yaitu melalui proses isolasi protein kacang-kacangan yang dikombinasikan dengan proses hidrolisis enzimatis (Kusumah *et al.*, 2020b). Enzim protease dapat mengubah protein dari bentuk kompleks menjadi bentuk sederhana yang diharapkan mampu menghasilkan daya cerna protein yang lebih baik. Konsentrasi enzim *alcalase* optimal pada proses isolasi protein kacang adalah 4% dengan dosis 3642 U/g menghasilkan *soy bean oligopeptides* (Cai *et al.*, 2014). Proses isolasi kacang merah dengan penambahan enzim protease sebesar 3% menghasilkan bubuk konsentrat protein dengan kadar protein sebesar 73,34% (Liu *et al.*, 2011). Isolasi protein kacang kedelai dengan penambahan enzim Corolase PP (10 mg enzyme/g SPI) menghasilkan *soy bean oligopeptides* yang memiliki sifat fungsional ACE inhibitor, *peptide antithrombotic* dan *antioxidative* (Coscueta *et al.*, 2019).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi optimum isolasi protein tepung kacang merah dan kacang hijau yang menghasilkan kadar protein tertinggi. Tahap modifikasi hidrolisis enzimatis dengan penambahan enzim bromelin bertujuan untuk menghasilkan isolat atau konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau dengan daya cerna yang baik. Enzim bromelin memiliki sifat karakteristik yaitu titik isoelektrik berada pada pH 9,5, suhu optimum berkisar antara 50°C, aktivitas spesifik 5-10 U/mg protein dan berwarna putih sampai kekuning-kuningan dengan bau khas. Enzim bromelin lebih mudah didapatkan dan memiliki harga yang lebih murah dibandingkan dengan enzim protease lainnya.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam proses isolasi protein adalah kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) (Argapura, Kabupaten Majalengka), kacang hijau (*Phaseolus raditus L.*) (Ciwaringin, Kabupaten Cirebon), akuades, asam klorida (HCl) 2N (merck),

natrium hidroksida (NaOH) 0,5 N (merck), *bromelain enzyme* (focusherb, Cina).

Pembuatan tepung kacang merah dan tepung kacang hijau (Pangastuti *et al.*, 2013)

Persiapan bahan baku yang dilakukan pada penelitian ini adalah proses penepungan biji kacang merah dan kacang hijau. Tahap ini diawali dengan pencucian dan sortasi kacang merah dan kacang hijau menggunakan ari bersih. Tujuannya adalah membersihkan dan memisahkan bagian kacang merah atau kacang hijau dari kontaminan. Selanjutnya, proses perendaman selama 11 jam menggunakan akuades untuk menginaktifkan asam fitat yang terdapat pada bagian kulit ari kacang merah dan kacang hijau. Kacang merah dan kacang hijau dikeringkan menggunakan sinar matahari selama 1–2 hari sampai kadar air <15%. Kacang merah dan kacang hijau yang sudah kering kemudian dilakukan penggilingan menggunakan *discmill* (FFC-23, Cina). Pengayakan tepung kacang merah dan kacang hijau menggunakan saringan 80 mesh.

Optimasi proses ekstraksi protein (Wang *et al.*, 2011)

Metode penelitian *Response Surface Methodology* (RSM) *Box-Behnken Design* melalui *Software Desain Expert* 10 dipilih untuk mengoptimasi kondisi proses ekstraksi protein kacang merah dan kacang hijau. Variabel yang digunakan pada proses ini adalah suhu ekstraksi (30-50°C), pH ekstraksi (8,50-9,50), dan lama ekstraksi (30-60 menit). Variabel bebas ditentukan berdasarkan *trial and error* dan kajian penelitian sebelumnya (Kusumah *et al.*, 2020b) untuk menentukan batas minimum dan maksimum. Berdasarkan program *Desain Expert RSM Box-Behnken Design* diperoleh 17 perlakuan dengan berbagai kombinasi suhu ekstraksi, pH ekstraksi, dan lama ekstraksi (Tabel 1). Respon

yang diukur dan dioptimasi adalah kadar protein per total solid (%) menggunakan metode kjeldahl (buchli, Swiss) (AOAC, 1990).

Isolasi protein kacang merah dan kacang hijau menggunakan metode asam basa yaitu melalui proses ekstraksi dan pengendapan memodifikasi teknik yang dilakukan oleh Wang *et al.* (2011). Setiap formula dibuat dari 40 g tepung kacang merah atau tepung kacang hijau. Pencampuran bahan dengan rasio tepung kacang merah:akuades adalah 1:10 (b/b). Kemudian diaduk selama 3 menit dan dilakukan pengecekan pH awal menggunakan pH meter (lutron pH208 portable). Hal yang sama juga dilakukan pada sampel tepung kacang hijau.

Proses selanjutnya adalah penyesuaian pH dengan menambahkan NaOH 0,5 N sampai pH menunjukkan nilai pH ekstraksi sesuai rancangan penelitian. Proses sentrifugasi I (Thermo scientific ST16 benchtop centrifuge, Jerman) dilakukan selama 15 menit pada kecepatan 4000-4500 rpm, tujuannya adalah untuk memisahkan residu yang mengendap dan supernatan (protein yang terlarut). Supernatan kemudian diambil untuk proses pengendapan. Supernatan ditambahkan HCl 2N sampai pH menunjukkan pH isoelektrik (pI) yaitu pH 4,56 (kacang merah) dan pH 4,81 (kacang hijau) (Kusumah *et al.*, 2020a). Proses pengendapan dilakukan pada suhu 30°C selama 10 menit. Proses sentrifugasi II dilakukan selama 15 menit pada kecepatan 4000-4500 rpm. Endapan protein yang dihasilkan kemudian dilakukan uji kadar protein dengan metode Kjeldahl.

Analisis respon dilakukan dengan menggunakan beberapa pilihan model *analysis of variance* (ANOVA) yaitu *linear*, *quadratic*, dan *cubic*. Pemilihan model ini ditentukan berdasarkan model yang memberikan nilai terbesar, menghasilkan nilai signifikansi ANOVA, dan non signifikansi pada *lack of fit* (Apriliyanti *et al.*, 2020).

Tabel 1. Data formulasi kondisi proses ekstraksi dan data respon kadar protein (%)

Run	Faktor A Suhu Ekstraksi (°C)	Faktor B pH Ekstraksi	Faktor C Lama Ekstraksi (Menit)	Respon Kadar Protein per Total Solid (%)	
				Kacang Merah	Kacang Hijau
1	30	8,50	45	86,53±1,15	85,36±2,96
2	30	9,00	30	86,98±0,05	89,93±5,96
3	30	9,00	60	87,37±6,34	89,64±0,60
4	30	9,50	45	89,42±2,74	86,49±6,24
5	40	8,50	30	93,20±0,87	91,59±1,57
6	40	8,50	60	75,71±7,40	91,38±2,98
7	40	9,00	45	90,60±5,16	84,40±2,73
8	40	9,00	45	76,74±8,11	92,44±0,27
9	40	9,00	45	68,95±9,50	90,26±8,01
10	40	9,00	45	74,66±3,10	82,64±4,70
11	40	9,00	45	59,78±8,50	86,47±2,27
12	40	9,50	30	77,90±8,34	78,02±0,88
13	40	9,50	60	76,07±3,90	81,99±2,87
14	50	8,50	45	48,14±1,50	85,58±10,06
15	50	9,00	30	53,09±6,41	76,51±5,10
16	50	9,00	60	53,42±2,91	88,42±6,70
17	50	9,50	45	46,30±3,30	71,97±7,78

Program *Desain Expert* 10 juga memberikan fitur grafik *contour plot* yang menunjukkan kombinasi antar komponen yang saling memengaruhi nilai respon dengan warna biru (nilai respon terendah) dan warna merah (nilai respon tertinggi). Bentuk permukaan dari hubungan interaksi antar komponen ini dapat dilihat lebih jelas pada grafik tiga dimensi (3-D) (Brahmah *et al.*, 2016). Formula dengan nilai *desirability* maksimum dipilih karena menunjukkan kemampuan Program *Desain Expert* 10 untuk memberikan nilai yang dikehendaki. Solusi yang dilakukan jika nilai *desirability* sama adalah memilih nilai respon yang paling tinggi (Maula *et al.*, 2019).

Tahap verifikasi atau validasi dilakukan dengan cara mengisolasi protein sesuai dengan kombinasi suhu ekstraksi, pH ekstraksi, dan lama ekstraksi terbaik dan menganalisis kadar protein per total solid (%). Verifikasi dilakukan dengan dua kali ulangan. Nilai validitas diukur dengan membandingkan nilai aktual dan nilai prediksi (Anihouvi *et al.*, 2011). Apabila terdapat kesesuaian antara nilai aktual dan nilai prediksi maka verifikasi dinyatakan baik (Muhandri *et al.*, 2017).

Modifikasi hidrolisis enzimatis (Liu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2016)

Modifikasi hidrolisis enzimatis bertujuan untuk menghasilkan konsentrat dengan bentuk oligopeptida sehingga memiliki daya cerna protein yang baik. Proses ini hanya menggunakan endapan terbaik yang dihasilkan pada tahap sebelumnya. Proses ini memodifikasi teknik yang telah dilakukan oleh Liu *et al.* (2011) dan Wang *et al.* (2016).

Endapan protein kacang merah dan kacang hijau terbaik dikeringkan menggunakan alat pengering *freeze dryer* (christ alpha 1-4 LD plus) pada suhu kurang lebih -50°C selama 24 jam. Bubuk konsentrat atau isolat yang telah kering kemudian dicampurkan dengan akuades. Rasio bubuk isolat atau konsentrat protein kacang merah:akuades adalah 1:5 (b/b). Rasio yang sama juga dilakukan pada bubuk isolat atau konsentrat protein kacang hijau.

Proses selanjutnya adalah penyesuaian pH dengan menambahkan NaOH 0,5 N sampai pH menunjukkan nilai pH 8,00 dan pemanasan sampai suhu 50°C . Pemberian enzim bromelin dengan konsentrasi 3% (b/b) dari berat bubuk konsentrat protein yang digunakan. Tahap selanjutnya dilakukan proses hidrolisis selama 60 menit. Kemudian proses inaktivasi enzim dengan cara pemanasan selama 15 menit pada suhu 90°C . Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 4000-4500 rpm selama 15 menit. Endapan yang dihasilkan kemudian dikeringkan menggunakan *freeze drayer* pada suhu kurang lebih -50°C selama 24 jam. Kosentrat protein kacang merah dan kacang hijau terhidrolisis enzimatis kemudian dilakukan pengamatan yaitu kadar air meto-

de gravimetri (AOAC, 1990), kadar protein metode kjeldhal (AOAC, 1990), dan uji daya cerna protein metode *in vitro* (Saunders *et al.*, 1973).

Pengujian daya cerna metode *in vitro* (Saunders *et al.*, 1973)

Penentuan daya cerna protein dilakukan dengan mengutip metode pengujian daya cerna protein secara *in vitro* yang dilakukan oleh Saunders *et al.* (1973). Enzim yang digunakan dalam penelitian ini adalah enzim tripsin (sigma), kimotripsin (sigma), dan pankreatin (sigma). Pengujian daya cerna protein secara *in vitro* dimulai dengan pencampuran bahan dengan penambahan buffer fosfat pH 8,00 pada sampel konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau agar menciptakan suasana basa. Setelah homogen, 10 mL larutan dicampurkan dengan 1,0 mL larutan multienzim (1,6 mg tripsin, 3,1 mg kimotripsin, dan 4 mg pankreatin). Proses inkubasi larutan sampel dilakukan pada suhu 30°C selama 10 menit untuk agar enzim dapat memecah protein. Pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-9200 (Rayleigh, Cina) pada panjang gelombang 578 nm dilakukan untuk menentukan daya cerna protein. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan indikator yaitu pereaksi *folin ciocalteau* yang memberikan perbedaan intensitas warna pada asam amino dan peptida hasil hidrolisis enzimatis dalam sampel. Daya cerna protein per kadar protein bubuk konsentrat protein kering (DCP) (%) dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\text{DCP (\%)} = \frac{100\%}{\% \text{ kadar protein bubu konsentrat protein}} \times$$

$$\left(\frac{\text{absorbansi sampel} - \text{absorbansi blanko sampel}}{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi blanko kontrol}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar protein konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau

Isolasi protein pada prinsipnya didasarkan atas dua proses utama yaitu ekstraksi dengan pelarut basa dan pengendapan dengan pelarut asam (Hatti-Kaul dan Mattiasson, 2011). Asam amino dapat bermuatan positif pada pH rendah, sedangkan pada pH tinggi dapat bermuatan negatif. Pada pH isoelektrik, asam amino berada pada keadaan dipolar atau *in zwitter* (Salgin *et al.*, 2012). Kelarutan protein bernilai paling kecil pada keadaan tersebut sehingga protein akan menggumpal dan mengendap (Kusumah *et al.*, 2020a). Perlakuan kondisi ekstraksi protein kacang merah dan kacang hijau yang bervariasi memberikan hasil nilai kadar protein yang berbeda.

Berdasarkan Tabel 1, dapat dilihat bahwa kisaran nilai kadar protein per total solid endapan protein kacang merah adalah $46,30 \pm 3,30$ hingga $93,20 \pm 0,87\%$, sedangkan untuk endapan kacang hijau adalah $71,97 \pm 7,78$ hingga $92,44 \pm 0,27\%$. Hasil ini menunjukkan bahwa kondisi ekstraksi protein kacang merah dan kacang hijau memberikan kadar protein yang berbeda-beda. Menurut Wang *et al.* (2011), endapan protein kacang hijau tertinggi dihasilkan pada suhu ekstraksi $31,74^\circ\text{C}$, pH 8,97, lama ekstraksi 33,24 menit dan menghasilkan rendemen protein 77,60%. Penelitian lain menyebutkan bahwa kondisi ekstraksi yang optimal untuk ekstraksi protein kacang hijau adalah pada suhu 40°C , pH 9,10 dan menghasilkan rendemen protein 77,32% (Du *et al.*, 2017).

Hasil analisis model optimasi (Tabel 2), menunjukkan bahwa model yang terpilih adalah kuadrat, karena model ini yang memiliki R^2 mendekati 1 yaitu 0,8432 untuk kacang merah dan 0,8354 untuk kacang hijau. Model kuadrat dipilih karena menunjukkan nilai yang signifikan ($P < 0,05$) yaitu 0,0363 (kacang merah) dan 0,0420 (kacang hijau). Nilai *lack of fit* endapan protein menunjukkan tidak signifikan ($P > 0,05$) yaitu 0,8411 (kacang merah) dan 0,7405 (kacang hijau).

Hasil analisis ragam (ANOVA) didapatkan secara otomatis dengan menggunakan menu *fit summary* dalam program *Desain Expert 10*. Model optimasi pada endapan protein kacang merah memiliki nilai $P < 0,05$ yaitu 0,0363 artinya signifikan. Pada variabel A (suhu ekstraksi) memiliki nilai $P < 0,05$ yaitu 0,0008 yang berarti signifikan. Berdasarkan hasil tersebut maka variasi perlakuan suhu ($30-50^\circ\text{C}$) dalam proses ekstraksi protein kacang merah dapat berpengaruh terhadap respon kadar protein endapan protein kacang merah. Hal ini di-

sebabkan karena daya ikat air menurun seiring dengan proses pemanasan yang membuat protein menjadi terdenaturasi (Andoyo *et al.*, 2015). Pemanasan juga dapat memberikan keuntungan yaitu menginaktifkan atau menurunkan protein inhibitor. Pemanasan juga dapat meminimalkan alergenitas pada kacang (Palupi *et al.*, 2015). Perlakuan pemanasan dapat memengaruhi sifat gelasi pada protein (Morand *et al.*, 2011). Perlakuan pH ekstraksi dan lama ekstraksi tidak berpengaruh terhadap respon kadar protein endapan protein kacang merah. Variabel pH ekstraksi dan lama ekstraksi memiliki nilai tidak signifikan ($P > 0,05$) yaitu masing-masing 0,6168 dan 0,5058.

Pada sampel kacang hijau, model optimasi pada endapan protein kacang hijau memiliki nilai $P < 0,05$ yaitu 0,0420 artinya signifikan. Pada variabel A (suhu ekstraksi) dan variabel B (pH ekstraksi) memiliki hasil yang signifikan. Berdasarkan hasil tersebut, variasi perlakuan suhu dan pH dalam proses ekstraksi protein kacang hijau dapat berpengaruh terhadap respon kadar protein endapan protein kacang hijau. Jumlah protein lebih banyak dihasilkan pada kondisi basa karena protein yang terlarut lebih mudah dipisahkan dari residu. Kondisi basa juga dapat memberikan efek yang merugikan yaitu merusak asam amino yang mengandung bebarang seperti lisin, metioni, triptopan, dan treonin (Kanetro, 2017). Variasi pH pada proses ekstraksi protein kacang memengaruhi kadar protein, kadar air, rendemen, kecerahan, daya serap air, daya serap minyak, kapasitas emulsi, stabilitas emulsi, kapasitas buih, serta stabilitas buih konsentrat protein kacang (Pratiwi *et al.*, 2018). Variabel C (lama ekstraksi) tidak berpengaruh terhadap respon kadar protein endapan protein kacang hijau dengan nilai $P > 0,05$ yaitu 0,1681.

Tabel 2. Analisis model optimasi

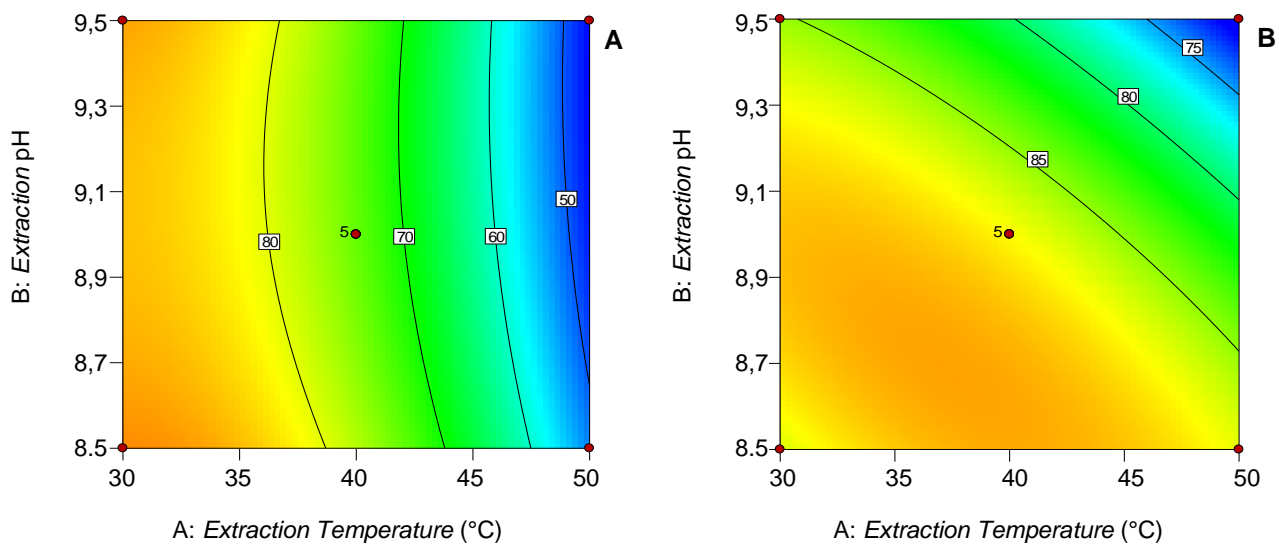
Sampel	Model	Signifikansi ($P < 0,05$)	Lack of Fit	R^2	Model Matematika
Endapan protein kacang merah	Kuadrat	0,0363	0,8411	0,8432	$Y = 74,15 - 18,67A - 1,74B - 2,33C - 1,18AB - 0,017AC + 3,92BC - 8,53A^2 + 1,98B^2 + 4,59C^2$
	Linear	0,0006	0,8275	0,7264	$Y = 73,23 - 18,67A - 1,74 - 2,33C$
	Kubik	0,2281	-	0,8700	$Y = 74,15 - 16,96A - 3,74B - 4,83C - 1,18AB - 0,017AC + 3,92BC - 8,53A^2 + 1,98B^2 + 4,59C^2 + 4A^2B + 5,01A^2C - 3,42AB^2$
Endapan protein kacang hijau	Kuadrat	0,0420	0,7405	0,8354	$Y = 87,24 - 3,62A - 4,43B + 1,92C - 3,69AB + 3,05AC + 1,05BC - 2,26A^2 - 2,64B^2 + 1,14C^2$
	Linear	0,0135	0,4735	0,5483	$Y = 85,48 - 3,62A - 4,43B + 1,92C$
	Kubik	0,2125	-	0,8758	$Y = 87,24 - 3,66A - 5,74B + 0,94C - 3,69AB + 3,05AC + 1,05BC - 2,26A^2 - 2,64B^2 + 1,14C^2 + 2,62A^2B + 1,97A^2C$

Keterangan: Faktor A= suhu ekstraksi ($^\circ\text{C}$); Faktor B= pH ekstraksi; Faktor C= lama ekstraksi (menit)

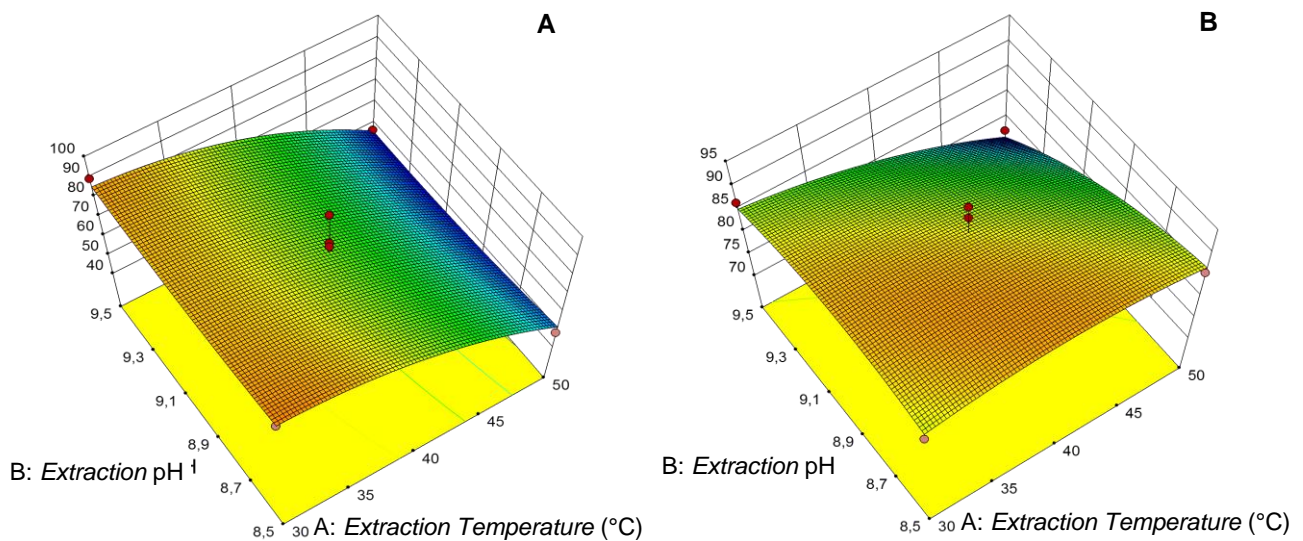
Berdasarkan grafik *contour plot* pada Gambar 1, menunjukkan bahwa nilai respon kadar protein endapan kacang merah dan kacang hijau ditentukan oleh kombinasi antar variabel suhu ekstraksi, pH ekstraksi, dan lama ekstraksi yang saling memengaruhi. Nilai respon terendah ditunjukkan dengan adanya warna biru pada grafik *contour plot*, yaitu kadar protein $46,30 \pm 3,30\%$ (kacang merah) dan $71,97 \pm 7,78\%$ (kacang hijau). Nilai respon tertinggi ditunjukkan dengan adanya warna merah pada grafik *contour plot* yaitu kadar protein $93,20 \pm 0,87\%$ (kacang merah) dan $92,44 \pm 0,27\%$ (kacang hijau). Program *Desain Expert 10* juga dapat memberikan bentuk permukaan dalam tampilan grafik 3D agar

dapat melihat lebih jelas hubungan interaksi antar variabel suhu ekstraksi, pH ekstraksi, dan lama ekstraksi dengan nilai respon kadar protein (Gambar 2). Sama seperti grafik *contour plot*, warna biru pada grafik menunjukkan nilai respon yang terendah, sedangkan warna merah menunjukkan nilai respon tertinggi.

Komponen pertama yang dioptimalkan adalah suhu ekstraksi dengan target minimal 30°C dan tingkat kepentingan 3+ (Tabel 3). Penentuan ini dikarenakan proses pemanasan dapat memengaruhi karakteristik protein kacang merah dan kacang hijau yaitu dengan terjadinya denaturasi protein (Andoyo *et al.*, 2014).



Gambar 1. Grafik *contour plot* hasil uji respon kadar protein kacang merah (A) dan kacang hijau (B)



Gambar 2. Grafik tiga dimensi hasil uji respon kadar protein kacang merah (A) dan kacang hijau (B)

Tabel 3. Komponen respon yang dioptimasi, target, batas, dan kepentingan pada tahapan optimasi formula

Sampel	Komponen Respon	Target/Goal	Batas Bawah/ Lower Limit	Batas Atas/ Upper Limit	Kepentingan/ Importance
Endapan protein kacang merah	Suhu ekstraksi (°C)	Minimal/Minimum	30	50	3+
	pH ekstraksi	kisaran/Inrange	8,50	9,50	3+
	Lama ekstraksi (menit)	kisaran/In range	30	60	3+
	Protein per Total Solid (%)	Maksimal/Maximum	46,30	93,20	5+
Endapan protein kacang hijau	Suhu ekstraksi (°C)	Minimal/Minimum	30	50	3+
	pH ekstraksi	kisaran/In range	8,50	9,50	3+
	Lama ekstraksi (menit)	kisaran/In range	30	60	3+
	Protein per Total Solid (%)	Maksimal/Maximum	71,97	92,44	5+

pH ekstraksi merupakan komponen kedua yang dioptimalkan dengan target kisaran 8,50-9,50 dan tingkat kepentingan 3+. Penentuan ini dikarenakan pada kondisi basa dapat memberikan protein yang lebih banyak tetapi dapat juga merusak asam amino yang mengandung belerang (Kanetro, 2017). Lama ekstraksi merupakan komponen ketiga yang dioptimalkan dengan tingkat kepentingan 3+ dan memiliki kisaran 30-60 menit. Penentuan ini dikarenakan ikatan peptida dapat terhidrolisis dan menguraikan struktur primer protein yang dipengaruhi oleh lama protein bereaksi dengan asam maupun basa (Lafarga *et al.*, 2018).

Respon yang dioptimalkan yaitu kadar protein dengan tingkat kepentingan 5+ dan ditargetkan memiliki nilai maksimal. Tingkat kepentingan dengan nilai 5 dipilih karena proses optimasi proses ekstraksi protein harus menghasilkan kadar protein semaksimal mungkin. Konsentrat protein kacang-kacangan harus mengandung protein sedikitnya 70%, sedangkan isolat protein harus mengandung lebih dari 90% protein dari bahan kering (Kanetro, 2017).

Optimasi proses ekstraksi protein kacang merah dan kacang hijau mendapatkan nilai respon kadar protein dengan melihat nilai *desirability*. Berdasarkan proses optimasi, program *Desain Expert* 10 memberikan 10 (sepuluh) solusi formula optimum (Tabel 4). Kondisi proses ekstraksi protein kacang merah yang direkomendasikan sebagai solusi optimal adalah dengan suhu ekstraksi 30°C, pH ekstraksi 8,60 dan lama ekstraksi 30,1 menit. Pada kondisi tersebut memiliki nilai *desirability* yang tinggi yaitu sebesar 1,000 dan diprediksi menghasilkan kadar protein per total solid tertinggi yaitu 95,99%. Hasil berbeda ditunjukkan pada proses ekstraksi protein kacang hijau, solusi formula optimal yang direkomendasikan yaitu kondisi proses ekstraksi protein dengan suhu ekstraksi 30°C, pH ekstraksi 8,83 dan lama ekstraksi 30,0 menit. Kondisi tersebut menghasilkan nilai *desirability* yang tinggi dengan nilai 0,961 dan diprediksi menghasilkan kadar protein per total solid tertinggi yaitu 91,17%.

Verifikasi atau validasi data dilakukan untuk memverifikasi tingkat kebenaran model yang direko-

mendasikan oleh program *Desain Expert* 10 (Tabel 5). Hasil uji laboratorium (nilai aktual) menunjukkan kadar protein per total solid pada endapan kacang merah sebesar 86,88±1,38% sedangkan nilai prediksi adalah 95,39%. Endapan protein kacang hijau memiliki kandungan protein sebesar 88,27±1,08%, sedangkan prediksi *Desain Expert* adalah 91,17%. Adapun nilai validitas pada endapan protein kacang merah dan kacang hijau masing-masing adalah 0,91 dan 0,97. Optimasi proses isolasi kacang merah dan kacang hijau memiliki nilai validasi mendekati 1. Berdasarkan hasil tersebut maka kondisi proses optimum yang direkomendasikan oleh program *Desain Expert* memiliki tingkat kebenaran yang tinggi dan dapat dipercaya.

Endapan protein kacang merah dan kacang hijau terbaik yang dihasilkan pada kondisi optimum kemudian dikeringkan menggunakan teknik *freeze drying* agar menghasilkan bubuk konsentrat protein kering. Pemilihan metode *freeze drying* dalam proses pengeringan bertujuan untuk menghindari protein dari kerusakan akibat suhu tinggi (Coscueta *et al.*, 2019; Du *et al.*, 2017).

Berat bubuk konsentrat protein kacang merah yang dihasilkan dari 40 g tepung kacang merah adalah 5,95 g, sehingga rendemen berat konsentrat protein kacang merah ada-lah 14,88%. Isolasi protein tepung kacang hijau menghasilkan rendemen berat sebesar 16,75% dengan berat bubuk konsentrat protein kacang hijau yang dihasilkan sebesar 6,70 g.

Kadar air konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau terhidrolisis enzimatis

Proses hidrolisis enzimatis pada konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau menggunakan enzim bromelin yang memiliki aktivitas enzim yaitu 1260 GDU (*Gelation Digestion Unit*) atau setara dengan 0,455 U/g. Berdasarkan Tabel 6, bubuk konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau yang terhidrolisis enzimatis memiliki kadar air berturut-turut 12,48±0,75 dan 11,17±0,17%. Mikroba dapat tumbuh pada bahan pangan dengan kadar air minimum sebesar 14-15%.

Tabel 4. Solusi formula optimum dan *desirability*

Sampel	No	Faktor A	Faktor B	Faktor C	Respon Kadar Protein per Total Solid (%)	<i>Desirability</i>
		Suhu Ekstraksi (°C)	pH Ekstraksi	Lama Ekstraksi (menit)		
Endapan protein kacang merah	1	30	8,63	30,1	95,3925	1,000
	2	30	8,52	32,8	94,6425	1,000
	3	30	8,52	33,3	94,2824	1,000
	4	30	8,60	31,4	94,6581	1,000
	5	30	8,80	30,0	93,2929	1,000
	6	30	8,76	30,6	93,2676	1,000
	7	30	8,56	32,9	94,0185	1,000
	8	30	8,57	31,4	95,0558	1,000
	9	30	8,60	30,1	95,9995	1,000
	10	30	8,75	30,1	93,8866	1,000
Endapan protein kacang hijau	1	30	8,83	30,0	91,1737	0,961
	2	30	8,83	30,0	91,1735	0,961
	3	30	8,83	30,0	91,1735	0,961
	4	30	8,82	30,0	91,1731	0,961
	5	30	8,84	30,0	91,1729	0,961
	6	30	8,81	30,0	91,1705	0,961
	7	30	8,81	30,0	91,1694	0,961
	8	30	8,85	30,0	91,1680	0,961
	9	30	8,89	30,0	91,1379	0,960
	10	30	8,81	30,1	91,1316	0,959

Tabel 5. Validasi solusi formula optimum

Sampel	Faktor A	Faktor B	Faktor C	Respon Kadar Protein per Total Solid (%)		Validitas
	Suhu Ekstraksi (°C)	pH Ekstraksi	Lama Ekstraksi (menit)	Nilai Aktual	Nilai Prediksi	
Endapan protein kacang merah	30	8,60	30,1	86,88±1,38	95,39	0,91
Endapan protein kacang hijau	30	8,83	30,0	88,27±1,08	91,17	0,97

Tabel 6. Data kadar air dan kadar protein bubuk konsentrat protein terhidrolisis enzimatis

Sampel	Kadar Air (%)	Kadar Protein (%)
Bubuk konsentrat protein kacang merah terhidrolisis enzimatis	12,48±0,75	78,43±0,67
Bubuk konsentrat protein kacang hijau terhidrolisis enzimatis	11,17±0,17	88,77±0,20

Konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau mengandung protein amfifatik yaitu adanya gugus asam amino hidrofilik (dapat berikatan dengan air) pada bagian luar dan gugus hidrofobik pada bagian dalam (Pangastuti *et al.*, 2013). Kandungan air konsentrat protein dipengaruhi oleh asam amino yang bersifat polar seperti asam glutamat, asam aspartat, lisin, arginin dan histidin yang mampu mengikat air (Pratiwi *et al.*, 2018). Nilai *activity water* (a_w) juga memengaruhi daya tahan bahan pangan terhadap serangan mikroba. a_w adalah jumlah air bebas yang digunakan mikroba untuk melakukan pertumbuhannya. Semakin kecil nilai kadar air produk, maka semakin kecil pula nilai a_w

produk tersebut (Rizqiati *et al.*, 2020). Berdasarkan hasil tersebut maka bubuk konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau dengan modifikasi hidrolisis enzimatis memiliki karakteristik kadar air yang baik.

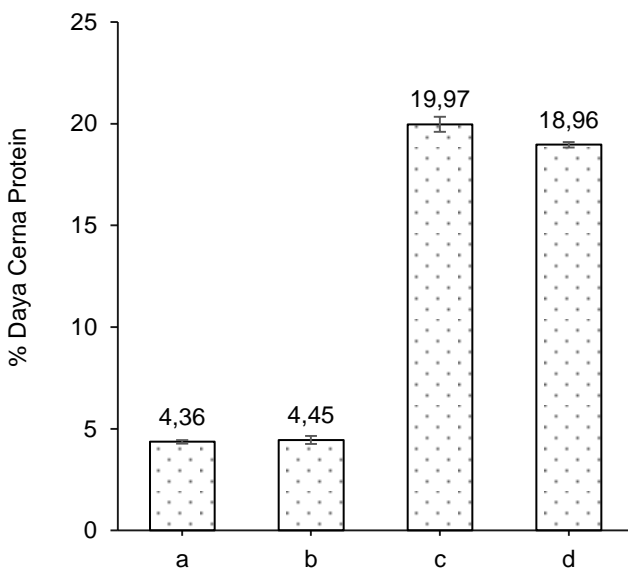
Kadar protein konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau terhidrolisis enzimatis

Berdasarkan Tabel 6, bubuk konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau terhidrolisis enzimatis memiliki kadar protein berturut-turut yaitu 78,43±0,67 dan 88,77±0,20%. Beberapa penelitian lain menghasilkan bubuk konsentrat protein kacang merah terhidrolisis enzimatis dengan kandungan protein sebesar 73,34% (Liu *et al.*, 2011) dan 80,8% (Al-Ruwaih *et al.*, 2018). Kadar protein bubuk konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian lainnya. Hal ini bisa disebabkan karena lama hidrolisis yang lebih pendek (60 menit) dibandingkan dengan penelitian lainnya (3,5-4 jam). Semakin lama protein bereaksi dengan asam atau basa kemungkinan besar ikatan peptida terhidrolisis sehingga struktur primer protein terurai (Lafarga *et al.*, 2018).

Kandungan protein pada bubuk konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau terhidrolisis enzimatis dapat dimanfaatkan untuk memperbaiki kualitas produk pangan atau sebagai *ingredient* fungsional. Jumlah asam amino hidrofilik dan hidrofobik mengendalikan sifat-sifat kelarutan, potensial pengikatan air, dan sifat-sifat permukaan (Houde *et al.*, 2018). Perlakuan hidrolisis enzimatis dapat meningkatkan kapasitas pengemulsian protein, meningkatkan kelarutan protein, dan menurunkan kapasitas penyerapan air dan minyak (Kanetro, 2017).

Daya cerna protein konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau terhidrolisis enzimatis

Berdasarkan Gambar 3, bubuk konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau memiliki daya cerna protein metode *in vitro* yaitu masing-masing $4,36 \pm 0,08$ dan $4,45 \pm 0,20\%$. Pengujian daya cerna protein juga dilakukan pada bubuk konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau terhidrolisis enzimatis yang menghasilkan nilai daya cerna protein jauh lebih tinggi yaitu masing-masing $19,97 \pm 0,37$ dan $18,96 \pm 0,14\%$.



Keterangan: a= Bubuk konsentrat protein kacang merah, b= Bubuk konsentrat protein kacang hijau, c= Bubuk konsentrat protein kacang merah terhidrolisis enzimatis, dan d= Bubuk konsentrat protein kacang hijau terhidrolisis enzimatis

Gambar 3. Daya cerna protein

Terjadi peningkatan daya cerna protein pada konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau terhidrolisis enzimatis. Hal ini mungkin disebabkan karena sebagian besar protein konsentrat tersebut sudah dihidrolisis oleh enzim bromelin pada proses hidrolisis enzimatis. Struktur protein dari konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau terhidrolisis

enzimatis diduga sudah terurai menjadi oligopeptida, tripeptida, dipeptida, atau asam amino (Cai *et al.*, 2014). Perlakuan pemanasan selama proses hidrolisis juga dapat meningkatkan daya cerna protein kacang (Ren *et al.*, 2018). Hal ini menyebabkan enzim tripsin dan kimotripsin bekerja lebih cepat pada bubuk konsentrat protein terhidrolisis enzimatis sehingga menghasilkan nilai daya cerna yang tinggi.

Daya cerna protein bubuk konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau dapat ditingkatkan dengan cara menghilangkan lemak atau minyak pada bahan baku tepung kacang merah dan kacang hijau. Inhibitor berupa minyak (*fase lipid*) dapat menghalangi kontak protein dan enzim (*fase aqueous*) yang menyebabkan afinitas substrat terhadap sisi katalitik enzim menjadi rendah (Restiani, 2016). Peningkatan konsentrasi dan aktivitas enzim bromelin dapat dilakukan untuk menyempurnakan proses hidrolisis enzimatis pada bubuk konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau (Kahiro *et al.*, 2017). Penggunaan jenis enzim protease yang lain selama proses hidrolisis enzimatis juga dapat dicoba untuk mengetahui perbedaan daya cerna protein konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau. Beberapa enzim lain yang dapat digunakan adalah *alcalase*, *flavourzyme*, pepsin, pankreatin, kimotripsin, papain, tripsin, dan *thermolisin* (Luna-Vital *et al.*, 2014).

Peptida bioaktif memiliki peranan penting sebagai bahan pangan fungsional diantaranya adalah sebagai antihipertensi, antioksidan, antimikroba, antitrombotik, dan lain sebagainya (Tamam *et al.*, 2018). Budseekoad *et al.* (2018) telah menghidrolisis protein kacang hijau dan menghasilkan oligopeptida dengan sifat *calcium* and *iron-binding* yang tersusun atas sekuen asam amino *Leu-Leu-Leu-Gly-Ile*, *Ala-Ile-Val-Ile-Leu*, dan *His-Ala-Asp-Ala-Asp*. Oligopeptida tersebut mengandung asam amino esensial dan memiliki sifat pengikat kalsium dan besi sebagai penunjang pertumbuhan dan jaringan tubuh.

Pangan tinggi protein yang mengandung banyak asam amino esensial dibutuhkan untuk proses pertumbuhan anak-anak. Pertumbuhan pada anak-anak tergantung pada lempeng pertumbuhan chondral (Baron *et al.*, 2015). Pertumbuhan tulang dan lempeng chondral diatur oleh mTORC1 dan ketersediaan asam amino seperti leusin dan lisin (Efeyan *et al.*, 2015). Apabila mTORC1 kekurangan asam amino maka dapat menekan untuk melakukan sintesis protein dan lipid (Laplante dan Sabatini, 2013). Anak yang kekurangan asupan asam amino esensial dapat memiliki risiko tinggi menjadi anak stunting. Berdasarkan hal tersebut, konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau terhidrolisis enzimatis dapat direkomendasikan sebagai sumber protein dan asam amino esensial yang dibutuhkan penderita stunting.

KESIMPULAN

Kondisi optimum proses ekstraksi protein kacang merah yaitu pada suhu 30°C dan pH 8,60 selama 30,1 menit yang memiliki kadar protein 86,88±1,38% dengan nilai validitas 0,91. Kondisi optimum proses ekstraksi protein kacang hijau yaitu pada suhu 30°C dan pH 8,83 selama 30 menit yang memiliki kadar protein 88,27±1,08% dengan nilai validitas 0,97. Proses modifikasi hidrolisis enzimatis menggunakan enzim bromelin mampu meningkatkan daya cerna protein bubuk konsentrat protein kacang merah dan kacang hijau sebesar 15,61 dan 14,51%.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Ruwaih N, Ahmed J, Mulla MF, Arfat YA. 2018. High-pressure assisted enzymatic proteolysis of kidney beans protein isolates and characterization of hydrolysates by functional, structural, rheological, and antioxidant properties. *LWT-Food Sci Technol* 100: 231-236. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.10.074.
- Almatsier S. 2013. Prinsip Dasar Ilmu Gizi. 77-104. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Andoyo R, Guyomarc'h F, Burel A, Famelart M. 2015. Spatial arrangement of casein micelles and whey protein aggregate in acid gels: Insight on mechanisms. *Food Hydrocoll* 51: 118-128. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.04.031.
- Andoyo R, Guyomarc'h F, Cauty C, Famelart M-H. 2014. Model mixtures evidence the respective roles of whey protein particles and casein micelles during acid gelation. *Food Hydrocoll* 37: 203-212. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2013.10.019.
- Anihouvi V, Saalia F, Sakyi-Dawson E, Ayernor G, Hounhouigan J. 2011. Response surface methodology for optimizing the fermentation conditions during the processing of cassava fish (*Pseudolithus* sp) into Lanhouin. *Int J Eng Sci Technol* 3: 7085-7095.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis (Volume 1). AOAC, Arlington, Virginia.
- Apriliyanti MW, Suryanegara MA, Wahyono A, Djamila S. 2020. Kondisi optimum perlakuan awal dan pengeringan kulit buah naga kering. *J Teknol Industri Pangan* 31: 155-163. DOI: 10.6066/jtip.2020.31.2.155.
- Baron J, Säwendahl L, de Luca F, Dauber A, Phillip M, Wit JM, Nilsson O. 2015. Short and tall stature: A new paradigm emerges. *Nat Rev Endocrinol* 11: 735-746. DOI: 10.1038/nrendo.2015.165.
- Braimah MN, Anozie AN, Odejobi OJ. 2016. Utilization of response surface methodology (RSM) in the optimization of crude oil refinery. *J Multidiscip Eng Sci Technol* 3: 4361-4369.
- Budseekoad S, Yupanqui CT, Sirinupong N, Alashi AM, Aluko RE, Youravong W. 2018. Structural and functional characterization of calcium and iron-binding peptides from mung bean protein hydrolysate. *J Funct Foods* 49: 333-341. DOI: 10.1016/j.jff.2018.07.041.
- Cai M-Y, Gu R-Z, Li C-Y, Ma Y, Dong Z, Liu W-Y, Jin Z-T, Lu J, Yi W-X. 2012. Pilot-scale production of soybean oligopeptides and antioxidant and antihypertensive effects *in vitro* and *in vivo*. *J Food Sci Technol* 51: 1866-1874. DOI: 10.1007/s13197-012-0701-4.
- Coscueta ER, Campos DA, Osório H, Nerli BB, Pintado M. 2019. Enzymatic soy protein hydrolysis: A tool for biofunctional food ingredient production. *Food Chem X* 1: 100006. DOI: 10.1016/j.fochx.2019.100006.
- Du M, Xie J, Gong B, Xu X, Tang W, Li X, Li, C. 2017. Extraction, physicochemical characteristics and functional properties of mung bean protein. *Food Hydrocoll* 76: 131-140. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2017.01.003.
- Efeyan A, Comb WC, Sabatini DM. 2015. Nutrient sensing mechanisms and pathways. *Nature* 517: 302-310. DOI: 10.1038/nature14190.
- Ernawati F, Prihatini M, Yuriesta A. 2016. Gambaran konsumsi protein nabati dan hewani pada anak balita stunting dan gizi kurang di Indonesia. *Penelitian Gizi dan Makanan* 39: 95-102.
- Gunarti DR, Rahmi H, Sadikin M. 2013. Isolation and purification of thiamine binding protein from mung bean. *Hayati-J Biosci* 20: 1-6. DOI: 10.4308/hjb.20.1.1.
- Hatti-Kaul R, Mattiasson B. 2011. Isolation and Purification of Proteins. In *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, Third Edition. Lund University Lund, Swedia.
- Houde M, Khodaei N, Benkerroum N, Karboune S. 2018. Barley protein concentrates: Extraction, structural and functional properties. *Food Chem* 254: 367-376. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.01.156.

- Kahiro SK, Kagira JM, Maina N, Karanja SM, Njonge FN. 2017. Enzymatic activity of bromelain from crude extracts of crown, peels and stem of pineapples from different agro-ecological zones of thika region, Kenya. *Asian J Biotechnol Bioresour Technol* 1: 1-6. DOI: 10.9734/AJB2T/2017/34314.
- Kanetro B. 2017. Teknologi Pengolahan dan Pangan Fungsional Kacang-Kacangan. 71-76 Palantaxia, Yogyakarta.
- Kusumah SH, Andoyo R, Rialita T. 2020a. Isolation and characterization of red bean and green bean protein using the extraction method and isoelectric pH. *SciMed J* 2: 77-85. DOI: 10.28991/SciMedJ-2020-0202-5.
- Kusumah SH, Andoyo R, Rialita T. 2020b. Protein isolation techniques of beans using different methods: A review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 443, International Conference on Food and Bio-Industry 2019, 29-30 July 2019, Bandung, Indonesia. DOI: 10.1088/1755-1315/443/1/012053.
- Lafarga T, Álvarez C, Bobo G, Aguiló-Aguayo I. 2018. Characterization of functional properties of proteins from ganxet beans (*Phaseolus vulgaris* L. var. *Ganxet*) isolated using an ultrasound-assisted methodology. *LWT-Food Sci Technol* 98: 106-112. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.08.033.
- Laplante M, Sabatini DM. 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149: 274-293. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.017.
- Liu Q, Jiang L, Li Y, Wang S, Wang M. 2011. Study on aqueous enzymatic extraction of red bean protein. *Procedia Eng* 15: 5035-5045. DOI: 10.1016/j.proeng.2011.08.936.
- Luna-Vital DA, Mojica L, de Mejia EG, Mendoza S, Loarca-Pina G. 2014. Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food Res Int* 76: 39-50. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.11.024.
- Maula A, Faridah DN, Muhandri T. 2019. Optimasi proses mi jagung varietas lokal dengan teknologi ekstrusi. *J Teknol Industri Pangan* 30: 110-118. DOI: 10.6066/jtip.2019.30.2.110.
- Morand M, Guyomarch'h F, Famelart M-H. 2011. How to tailor heat-induced whey protein/k-casein complexes as a means to investigated the acid gelation of milk-a review. *Dairy Sci Technol* 91: 97-126. DOI: 10.1007/s13594-011-0013-x.
- Muhandri T, Subarna, Koswara S, Nurtama B, Ariefianto DI, Fatmala D. 2017. Optimasi pembuatan sohun ubi jalar menggunakan ekstruder pemasak-pencetak. *J Teknol Industri Pangan* 28: 36-45. DOI: 10.6066/jtip.2017.28.1.36.
- Palupi NS, Sitorus SR, Kusnandar F. 2015. Perubahan alergenitas protein kacang kedelai dan kacang bogor akibat pengolahan dengan panas. *J Teknol Industri Pangan* 26: 222-231. DOI: 10.6066/jtip.2015.26.2.222.
- Pangastuti HA, Affandi DR, Ishartani D. 2013. Karakteristik sifat fisik dan kimia tepung kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dengan beberapa perlakuan pendahuluan. *J Teknosains Pangan* 2: 20-29.
- Pratiwi H, Yusasrini NLA, Putra INK. 2018. Pengaruh pH ekstraksi terhadap rendemen, sifat fisiko-kimia dan fungsional konsentrat protein kacang guide. *J ITEPA* 7: 1-11. DOI: 10.24843/itepa.2018.v07.i01.p01.
- Ren C, Xiong W, Peng D, He Y, Zhou P, Li J, Li B. 2018. Effect of thermal sterilization on soy protein isolate/polyphenol complexes: Aspects of structure, in vitro digestibility and antioxidant activity. *Food Res Int* 112: 284-290. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.06.034.
- Restiani R. 2016. Hidrolisis secara enzimatis protein bungkil biji nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) menggunakan bromelain. *Biota* 1: 103-110. DOI: 10.24002/biota.v1i3.1226.
- Rizqiati H, Nurwantoro, Febrisiantosa A, Shauma CA, Khasanah R. 2020. Pengaruh isolat protein kedelai terhadap karakteristik fisik dan kimia kefir bubuk. *J Pangan Argoindustri* 8: 111-121. DOI: 10.21776/ub.jpa.2020.008.03.1
- Salgin S, Salgin U, Bahadir S. 2012. Zeta potentials and isoelectric points of biomolecules: The effect of ion types and ionic strengths. *Int J Electrochem Sci* 7: 12404-12414.
- Saunders RM, Connor MA, Booth AN. 1973. Measurement of digestibility of alfalfa protein concentrates by *in vivo* and *in vitro* Methods. *J Nutr* 130: 530-535. DOI: 10.1093/jn/103.4.530.
- Semba RD, Shardell M, Ashour FAS, Moaddel R, Trehan I, Maleta KM, Ordiz MI, Kraemer K, Khadeer MA, Ferrucci L, Manary MJ. 2016. Child stunting is associated with low circulating essential amino acids. *EBioMed* 6: 246-252. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.02.030.
- Tamam B, Syah D, Lioe HN, Suhartono MT, Kusuma WA. 2018. Beberapa pencari berbasis sekuens untuk mengenali sifat fungsional peptida bioaktif: Studi eksplorasi. *J Teknol Industri Pangan* 29: 1-9. DOI: 10.6066/jtip.2018.29.1.1.

- Wang M, Jiang L, Li Y, Wang S, Sui X. 2011. Optimization of extraction process of protein isolate from mung bean. *Procedia Eng* 15: 5250-5258. DOI: 10.1016/j.proeng.2011.08.973.
- Wang Q, Shi A, Liu H, Liu L, Zhang Y, Li N, Gong K, Yu M, Zheng L. 2016. Chapter 5-Peanut by-products utilization technology. 211-236. Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-809595-9.00005-3.
- Yusuf AA, Komarulzaman A, Alisjahbana AS, Anna Z, Ghina AA, Setiawan A, Megananda. 2018. *Seri Menyomgsong SDGs: Kesiapan Kabupaten/Kota di Provinsi Jawa Barat*. Unpad Press, Bandung.
- Zhu Y-S, Shuai S, FitzGerald R. 2018. Mung bean proteins and peptides: Nutritional, functional and bioactive properties. *Food Nutr Res* 62: 1-11. DOI: 10.29219/fnr.v62.1290.